胀果甘草粗多糖及其纯化多糖对树突状细胞成熟和抗肿瘤作用的影响及机制Δ

娜迪热木·肖克拉提*，俞永婷，卢泳强，周朝曦，张丽丽，丛媛媛#（新疆医科大学药学院，乌鲁木齐 830011）

中图分类号 R285.5；R965 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2024）20-2453-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.20.02

摘 要 目的 研究胀果甘草粗多糖（GiP）及其纯化多糖GiP-B1对荷瘤小鼠树突状细胞（DC）成熟和抗肿瘤作用的影响及机制。**方法** 将体外培养的肝癌细胞H22荷瘤小鼠未成熟DC（imDC）分为对照组、肿瘤坏死因子α（TNF-α）组、GiP组及GiP-B1组，检测荷瘤小鼠成熟DC（mDC）的细胞活力，表面标志物（CD11c、CD80、CD86、MHC-Ⅱ）阳性表达率，白细胞介素12p70（IL-12p70）及IL-4水平；通过荷瘤小鼠mDC与$CD4^+$T淋巴细胞共培养生成CD4-细胞毒性T细胞（CD4-CTL），检测刺激指数，CD4-CTL上清液中IL-12p70、干扰素-γ（IFN-γ）、IL-4、IL-10水平及对H22细胞的杀伤活性；检测共培养后荷瘤小鼠mDC中IL-12、IL-12受体（IL-12R）、信号转导和转录激活因子4（STAT-4）mRNA表达量，以及IL-12Rβ2蛋白表达量，核转录因子κB（NF-κB）p65、STAT-4蛋白磷酸化水平。**结果** 与对照组比较，GiP组与GiP-B1组荷瘤小鼠mDC细胞活力、MHC-Ⅱ阳性表达率以及IL-12p70、IL-4水平均显著升高（$P<0.05$），CD11c、CD80、CD86阳性表达率均有升高趋势，但差异均无统计学意义（$P>0.05$）。共培养后刺激指数、IL-12p70、IFN-γ水平均显著升高（$P<0.05$），IL-4、IL-10（GiP组除外）水平均显著降低（$P<0.05$），对H22细胞的杀伤活性均显著增强（$P<0.05$）；荷瘤小鼠mDC中IL-12、IL-12R（GiP组除外）、STAT-4 mRNA表达量，IL-12Rβ2蛋白表达量以及NF-κB p65、STAT-4蛋白磷酸化水平均显著升高（$P<0.05$）。**结论** GiP及GiP-B1对荷瘤小鼠DC的成熟有较好的促进作用，能有效刺激$CD4^+$T细胞增殖并增强CD4-CTL的抗肿瘤活性，其作用机制可能与激活IL-12/NF-κB/STAT-4信号通路有关。

关键词 胀果甘草多糖；树突状细胞；IL-12/NF-κB/STAT-4信号通路；细胞毒性T淋巴细胞；抗肿瘤

Effects and mechanism of *Glycyrrhiza inflata* polysaccharides on the maturation and anti-tumor effect of dendritic cell

Nadiremu·Xiaokelati，YU Yongting，LU Yongqiang，ZHOU Zhaoxi，ZHANG Lili，CONG Yuanyuan（College of Pharmacy，Xinjiang Medical University，Urumqi 830011，China）

ABSTRACT OBJECTIVE To investigate the effects and mechanism of *Glycyrrhiza inflata* polysaccharides（GiP）and GiP-B1 on the maturation and anti-tumor effect of dendritic cell（DC）. **METHODS** The immature DC（imDC）of hepatocellular carcinoma cell H22 tumor-bearing mice cultured *in vitro* were divided into control group，tumor necrosis factor-α（TNF-α）group，GiP group，and GiP-B1 group. The viability，positive expressions of surface markers（CD11c，CD80，CD86，MHC-Ⅱ），the levels of interleukin-12p70（IL-12p70）and IL-4 in mature DC（mDC）of tumor-bearing mice were detected. mDC and $CD4^+$T lymphocytes were co-cultured to generate CD4-cytotoxic T cell（CD4-CTL）；stimulation index，the levels of IL-12p70，interferon-γ（IFN-γ），IL-4 and IL-10，the killing activity of CD4-CTL to H22 cell were detected. mRNA expressions of IL-12，IL-12 receptor（IL-12R），signal transducer and activator of transcription-4（STAT-4），as well as the protein expression of IL-12 receptor β2（IL-12Rβ2），phosphorylation levels of nuclear factor-kappa B（NF-κB）p65 and STAT-4 proteins in mDC were detected after co-culture. **RESULTS** Compared with the control group，the viability of mDC，the positive expressions of MHC-Ⅱ，and the levels of IL-12p70 and IL-4 were increased significantly in GiP group and GiP-B1 group（$P<0.05$）. The positive expressions of CD11c，CD80 and CD86 showed an increasing trend，but the differences were not statistically significant（$P>0.05$）. After co-culturing，the stimulation index，the levels of IL-12p70 and IFN-γ were significantly increased（$P<0.05$），while the levels of IL-4 and IL-10（except for the GiP group）were significantly decreased（$P<0.05$）；the cytotoxicity against H22 cells was significantly enhanced（$P<0.05$）. mRNA expressions of IL-12 and IL-12R（except for GiP group）and STAT-4，protein expression of IL-12Rβ2 as well as phosphorylation levels of NF-κB p65 and STAT-4 protein were increased significantly in mDC（$P<0.05$）. **CONCLUSIONS** GiP and GiP-B1 have a good promoting effect on the maturation of DC in tumor-bearing mice，effectively stimulate $CD4^+$T cell proliferation，enhance the anti-tumor activity of CD4-CTL，and its mechanism may be related to activating IL-12/NF-κB/STAT-4 signaling pathway.

KEYWORDS *Glycyrrhiza inflata* polysaccharides；dendritic cell；IL-12/NF-κB/STAT-4 signaling pathway；cytotoxic T lymphocytes；anti-tumor

Δ**基金项目** 国家自然科学基金项目（No.81960702）；新疆维吾尔自治区重点实验室项目（No.XJDX1713）

＊**第一作者** 硕士。研究方向：活性多糖的开发与应用。E-mail：ndrm27@foxmail.com

＃**通信作者** 教授，硕士生导师，博士。研究方向：天然药用资源的开发与应用。E-mail：congyyxj@126.com

肝癌是全球死亡率极高、年发病率呈上升趋势且预后差的肿瘤，采用经典疗法治疗后易出现术后并发症、化疗药耐药等情况[1]。肿瘤免疫疗法可通过增强机体固有免疫和/或适应性免疫，从而提高其对肿瘤细胞的控制和杀伤能力，其中树突状细胞（dendritic cell，DC）疫苗在肿瘤治疗中发挥了重要作用[2]。DC是一类多功能且最有效的抗原提呈细胞（antigen presenting cell，APC），具有强大的免疫活性，根据其活化成熟程度分为未成熟DC（immature DC，imDC）和成熟DC（mature DC，mDC）；imDC的抗原摄取加工能力虽强，但抗原提呈及激活细胞毒性T淋巴细胞（简称“T细胞”）能力有限，而mDC不仅抗原提呈能力强，还能提供T细胞激活所需的所有信号[3]。已有研究发现，处于肿瘤环境中的mDC数量不足及其抗原提呈功能缺陷、imDC过多聚集会导致DC疫苗达不到预期疗效[4]。信号转导和转录激活因子4（signal transducer and activator of transcription-4，STAT-4）能诱导imDC成熟并增强其对T细胞的激活能力，而激活Toll样受体/核转录因子κB（nuclear factor-kappa B，NF-κB）信号通路则能够上调STAT-4表达[5]。因此，研发促进imDC成熟、改善并提高mDC抗原提呈功能的药物，对于提高DC疫苗作用具有重要意义。

多糖是新疆特色药用植物胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Batal.中具有免疫调节作用的活性成分。本课题组前期研究发现，胀果甘草粗多糖（*G. inflata* polysaccharides，GiP）及其纯化多糖GiP-B1可在体外通过激活Toll样受体/NF-κB信号通路来促进imDC成熟，提高白细胞介素12（interleukin-12，IL-12）分泌和抗原提呈功能，从而发挥增强免疫功能的作用[6]。研究发现，GiP及GiP-B1佐助的DC疫苗对肝癌细胞H22荷瘤小鼠具有抗肿瘤作用，但其作用机制是否与GiP、GiP-B1调节肿瘤中DC的功能有关尚不明确[7]。为此，本研究探讨GiP及GiP-B1对荷瘤小鼠imDC促成熟的影响，并通过共培养体系评价GiP及GiP-B1促成熟的荷瘤小鼠mDC以T细胞为介导的抗肿瘤能力以及作用机制，以期为开发胀果甘草多糖-DC疫苗提供理论基础和实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

HERACELL 150i型CO_2恒温细胞培养箱、Multiskan GO型全波长酶标仪、NanoDrop2000/200C型核酸蛋白定量仪均购自美国Thermo Fisher Scientific公司；AB135-S型电子分析天平购自瑞士Mettler Toledo公司；3-18K型低温离心机购自德国Sigma公司；HH-S4型恒温水浴锅购自江苏金怡仪器科技有限公司；LSRFortessa型流式细胞仪购自美国BD公司；0.4 μm孔径Transwell嵌套装置购自北京兰杰柯科技有限公司；QuantStudio 6型实时定量聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）系统购自美国ABI公司；DYCZ-24DN型电泳仪购自北京六一生物科技有限公司；SH-523型化学发光成像系统购自杭州申花科技有限公司。

1.2 主要药品与试剂

GiP由本课题组前期按照文献方法[8]从胀果甘草 *G. inflata* Bat.中提取所得，含量为52.66%；通过柱层析法进行纯化、精制得到GiP-B1，含量为100%，分子量约为2.0×10^6 Da，具有聚鼠李糖-半乳糖醛酸主链。

重组小鼠肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）（批号061454-1）购自美国PeproTech公司；小鼠骨髓imDC完全培养基（批号CM-M151A）购自武汉普诺赛生命科技有限公司；RPMI-1640培养基、青霉素-链霉素混合液（双抗）、磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline，PBS）（批号分别为2152424、2245296、2201008）均购自上海龙田生物科技有限公司；胎牛血清（批号42G5093K）购自美国Gibco公司；CCK-8试剂盒（批号PM508）购自日本同仁化学研究所；抗小鼠的mDC表面标志物CD11c、CD86、CD80、MHC-Ⅱ单克隆抗体（批号分别为B383301、B318893、B321317、B336920）均购自美国BioLegend公司；$CD4^+$T细胞磁珠分选试剂盒（批号130-104-454）购自德国Miltenyi Biotec公司；BCA蛋白定量试剂盒、小鼠脾淋巴细胞分离试剂盒、RIPA组织/细胞裂解液（批号分别为PC0020、P8860、R0010）均购自北京索莱宝科技有限公司；乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）细胞毒性检测试剂盒（批号C0017）购自上海碧云天生物技术股份有限公司；小鼠IL-12p70、干扰素-γ（interferon-γ，IFN-γ）、IL-4、IL-10酶联免疫吸附测定实验（ELISA）试剂盒（批号分别为EK0422、EK0375、EK0405、EK0417）和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗（批号BA1054）均购自武汉博士德生物工程有限公司；细胞总RNA提取试剂盒（批号C0017）购自成都福际生物技术有限公司；SYBR Green Mix荧光定量试剂、反转录试剂盒（批号分别为Q111-02、R223-01）均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；兔抗小鼠NF-κB p65、STAT-4单克隆抗体（批号分别为ab32536、ab284408）均购自英国Abcam公司；兔抗小鼠IL-12受体β2（IL-12Rβ2）单克隆抗体（批号A10348）购自武汉爱博泰克生物科技有限公司；兔抗小鼠磷酸化NF-κB p65（phosphorylated NF-κB p65，p-NF-κB p65）、磷酸化STAT-4（phosphorylated STAT-4，p-STAT-4）多克隆抗体（批号分别为AF2006、AF3441）均购自江苏亲科生物研究中心有限公司；小鼠抗*β*-肌动蛋白（*β*-actin）单克隆抗体（批号66009-1-Ig）购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 实验动物

本研究所用动物为健康C57BL/6雄性小鼠与昆明种雌性小鼠，SPF级，6～8周龄，体重18～20 g，分别购自新疆医科大学动物实验中心、湖南斯莱克景达实验动物有限公司、北京维通利华实验动物技术有限公司，实验动物生产许可证号分别为SCXK（新）2018-0002、SCXK（湘）2019-0004、SCXK（京）2021-0006。本研究得到新疆医科大学实验动物伦理委员会审批，伦理审批号为IACUC-20210405-1。

1.4 细胞株

小鼠肝癌细胞H22（批号CL-0341）购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法

2.1 H22细胞培养上清液及H22冻融抗原的制备

用含10%胎牛血清、1%双抗的RPMI-1640完全培养基，在37 ℃、5%CO_2培养箱中培养H22细胞，待细胞长至80%～90%时即可传代。待H22细胞呈对数生长期时，收集细胞，离心，取上清液置于－80 ℃冰箱中保存，备用。取细胞沉淀，用RPMI-1640完全培养基重悬，调整密度为1×10^7个/mL，反复冻融5次，离心，取上清液即为H22冻融抗原；留少许冻融抗原置于冰上测抗原浓度，其余冻融抗原置于－80 ℃冰箱中保存，备用。

2.2 荷瘤小鼠造模与imDC的制备

取对数生长期的H22细胞，离心，取细胞沉淀，用PBS调整密度为1×10^7个/mL，然后取5只健康昆明种雌性小鼠，均于腹腔接种0.2 mL以保种传代。腹腔传代第5天，抽取乳白色腹水，洗涤，重悬，再次接种到另外5只健康昆明种雌性小鼠腹腔，连续传3代，抽取腹腔生长旺盛的腹水H22细胞，洗涤，用PBS调整密度为1×10^7个/mL。随后取12只健康C57BL/6雄性小鼠，均于右腋皮下注射该细胞悬液0.1 mL，以腋下形成黄豆粒大小的包块作为荷瘤小鼠造模成功。

将造模成功的荷瘤小鼠颈椎脱臼处死，在无菌条件下取出股骨和胫骨，剪去骨头两端，用RPMI-1640基础培养基冲洗骨髓腔内细胞至骨髓变白，然后反复吹打骨髓细胞悬液，过滤，洗涤，离心，取上清液用imDC完全培养基重悬细胞，在CO_2恒温培养箱中静置培养48 h后，用含20%H22细胞培养上清液的imDC完全培养基全量换液，第4天半量换液，培养至第6天的细胞即为荷瘤小鼠imDC。

2.3 GiP及GiP-B1对荷瘤小鼠imDC促成熟作用的研究

2.3.1 GiP及GiP-B1给药浓度和作用时间的筛选

采用CCK-8法进行检测。取“2.2”项下荷瘤小鼠imDC，以2×10^4个/孔接种于96孔板中，分为对照组、TNF-α组（20 ng/mL[9]）、GiP及GiP-B1不同质量浓度组（50、100、200、400 μg/mL），每组设3个复孔。各孔加入含或不含相应药物的imDC完全培养基培养24、48 h，培养结束前4 h，各孔加入4 μg/mL H22冻融抗原；培养结束后，加入含10%CCK-8试剂的培养基，于37 ℃避光孵育2 h。采用酶标仪测定450 nm波长处各孔mDC的光密度（optical density，OD）值，计算细胞活力：细胞活力（%）=（实验组OD值－培养基对照的OD值）/（对照组OD值－培养基对照的OD值）×100%。根据检测结果筛选GiP及GiP-B1的最佳给药浓度和作用时间。

2.3.2 荷瘤小鼠mDC中表面标志物阳性表达率的检测

采用流式细胞术进行检测。取“2.2”项下荷瘤小鼠imDC，以1×10^6个/孔接种于6孔板中，按照“2.3.1”项下方法分组、给药（GiP及GiP-B1的给药浓度均100 μg/mL），作用时间为24 h（根据“2.3.1”项下结果设置）。培养结束后，收集细胞，离心，弃上清液，用PBS洗涤2次，重悬，分别加入CD11c、CD80、CD86、MHC-Ⅱ单克隆抗体各2 μL，4 ℃下避光孵育30 min；用PBS洗去未结合的抗体，离心，弃上清液；细胞用PBS重悬，采用流式细胞仪和Flow Jo 10.8.1软件检测细胞中CD11c、CD80、CD86、MHC-Ⅱ阳性表达率。

2.3.3 荷瘤小鼠mDC上清液中IL-12p70、IL-4水平的检测

采用ELISA法进行检测。按照“2.3.2”项下方法分组、给药、培养后，收集细胞培养上清液，按照ELISA试剂盒说明书方法操作，采用酶标仪检测上清液中IL-12p70、IL-4水平。

2.4 GiP及GiP-B1促成熟的荷瘤小鼠mDC的抗肿瘤作用及机制研究

2.4.1 荷瘤小鼠mDC刺激$CD4^+$T细胞增殖的作用及二者共培养比例的筛选

在无菌条件下取出健康C57BL/6雄性小鼠脾脏，分离脾淋巴细胞，借助磁珠分选试剂盒筛选、纯化后得$CD4^+$T细胞。取荷瘤小鼠imDC，按照“2.3.2”项下方法分组、给药、培养后，离心，收集细胞（即荷瘤小鼠mDC）。取荷瘤小鼠mDC与$CD4^+$T细胞，以每孔各100 μL接种于96孔板中，二者比例分别为1∶5、1∶10、1∶20、1∶40（以细胞数量计，下同），每组设3个复孔；同时设置刺激细胞对照组（只接种荷瘤小鼠mDC，用于观察细胞活力）与反应细胞对照组（只接种$CD4^+$T细胞）。共培养24 h后生成CD4-细胞毒性T细胞（CD4-CTL），加入含10%CCK-8试剂的培养基，于37 ℃避光孵育2 h。采用酶标仪检测450 nm波长处各孔的OD值，计算刺激指数：刺激指数=（实验组OD值－培养基对照的OD值）/（反应细胞对照组OD值－培养基对照的OD值）。刺激指数越大，$CD4^+$T细胞增殖越明显，说明经GiP及GiP-B1促成熟的mDC具有刺激活化T细胞的能力[10]。根据检测结果筛选荷瘤小鼠mDC与$CD4^+$T细胞共培养的最佳比例。

2.4.2 CD4-CTL上清液中IL-12p70、IFN-γ、IL-4、IL-10水平的检测

采用ELISA法进行检测。按照“2.4.1”项下方法分组、给药、共培养，荷瘤小鼠mDC与$CD4^+$T细胞共培养的比例为1∶5（根据“2.4.1”项下结果设置）。共培养24 h后，收集细胞培养上清液，按照ELISA试剂盒说明书方法操作，采用酶标仪检测上清液中IL-12p70、IFN-γ、IL-4、IL-10水平。

2.4.3 CD4-CTL对H22细胞的杀伤活性检测

按照“2.4.2”项下方法分组、给药、共培养24 h后，收集悬浮细胞（即CD4-CTL）。取CD4-CTL（效应细胞）和H22细胞（靶细胞），以每孔各100 μL接种于96孔板中，效应细胞与靶细胞比（以下简称“效靶比”）分别为10∶1、20∶1、50∶1（以细胞数量计），培养24 h，每组设3个复孔；

同时设置各效靶比对应的效应细胞自然释放组（只加效应细胞）、靶细胞自然释放组（只加靶细胞）、靶细胞最大释放组（加靶细胞和LDH释放剂）。培养结束前1 h，在靶细胞最大释放组中加入LDH释放剂2 μL，于37 ℃避光孵育1 h。培养结束后，离心，吸出各孔等体积上清液，加入到新的96孔板中，每孔加入LDH工作液60 μL，混匀，室温下避光孵育30 min；采用酶标仪检测490 nm波长处各孔的OD值，计算杀伤活性：杀伤活性（%）=（实验组OD值－效应细胞自然释放组OD值－靶细胞自然释放组OD）/（靶细胞最大释放组OD值－靶细胞自然释放组OD）×100%。

2.4.4　共培养后荷瘤小鼠mDC中IL-12、IL-12R、STAT-4 mRNA表达检测

采用实时定量PCR法进行检测。取荷瘤小鼠imDC，按照“2.3.2”项下方法分组、给药、培养后，离心，取荷瘤小鼠mDC接种于Transwell嵌套装置上室，将“2.4.1”项下纯化后得到的$CD4^+$T细胞接种于下室，共培养比例为1∶5（根据“2.4.1”项下结果设置）。共培养24 h后，收集并提取Transwell装置上室内各组mDC总RNA，反转录为cDNA，以上述cDNA为模板进行PCR扩增。反应体系（20 μL）包含cDNA模板4 μL，SYBR Green Master Mix 10 μL，正、反向引物各0.4 μL，50×ROX Reference Dye 2 0.4 μL，ddH_2O 4.8 μL。反应条件为：95 ℃预变性10 min；95 ℃变性15 s，60 ℃退火延伸60 s，共40个循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算IL-12、IL-12R、STAT-4 mRNA表达量。引物由擎科生物科技（北京）股份有限公司设计、合成，其序列及产物长度见表1。

表1　PCR扩增引物序列及产物长度

基因	引物序列（5′-3′）	产物长度/bp
GAPDH	正向引物：ATGGGTGTGAACCACGAGA	229
	反向引物：CAGGGATGATGTTCTGGGCA	
IL-12	正向引物：ATGTGGAATGGCGTCTC	111
	反向引物：GTCTCCTCGGCAGTTGG	
IL-12R	正向引物：CACCCCAGTGAACTACCTT	208
	反向引物：GGAGTCATAGCCCATCTTT	
STAT-4	正向引物：AAACCTGAGCCCAACGA	145
	反向引物：CAAAGCCGAAGAAATAA	

2.4.5　共培养后荷瘤小鼠mDC中IL-12/NF-κB/STAT-4信号通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法进行检测。取荷瘤小鼠mDC按照“2.4.4”项下方法分组、给药、共培养24 h后，取Transwell装置上室内各组mDC，充分裂解，离心，取上清液，测定蛋白浓度后煮沸变性。取变性蛋白样品适量，经电泳分离后转膜，封闭，加入β-actin、NF-κB p65、p-NF-κB p65、IL-12Rβ2、STAT-4、p-STAT-4一抗（稀释比例分别为1∶5 000、1∶50 000、1∶1 000、1∶1 000、1∶1 000、1∶1 000），于4 ℃孵育过夜；加入相应二抗（稀释比例为1∶10 000），室温下孵育2 h；以化学发光法显色，采用Image-Pro Plus 6.0软件分析蛋白条带。以目的蛋白与内参蛋白（β-actin）的灰度值比值表示目的蛋白的表达量，再进一步以p-NF-κB p65与NF-κB p65、p-STAT-4与STAT-4的蛋白表达量比值表示NF-κB、STAT-4蛋白的磷酸化水平。

2.5　统计学方法

采用SPSS 25软件对数据进行统计分析。数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　GiP及GiP-B1对荷瘤小鼠imDC的促成熟作用

3.1.1　GiP及GiP-B1的给药浓度和作用时间

经100 μg/mL GiP，50、100 μg/mL GiP-B1干预24 h后，mDC细胞活力分别为（133.45±15.16）%、（126.50±13.17）%、（132.49±12.05）%（$n=3$），均显著高于对照组（细胞活力为100%）（$P<0.05$），其中100 μg/mL GiP-B1组的mDC细胞活力显著高于50 μg/mL GiP-B1组（$P<0.05$）。其余各组mDC细胞活力与对照组比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。故选择后续实验GiP及GiP-B1的给药浓度为100 μg/mL，作用时间为24 h。

3.1.2　GiP及GiP-B1对荷瘤小鼠mDC中表面标志物阳性表达率的影响

与对照组比较，TNF-α组、GiP组与GiP-B1组荷瘤小鼠mDC中MHC-Ⅱ阳性表达率均显著升高（$P<0.05$），CD11c、CD80、CD86阳性表达率均有升高趋势，但与对照组比较差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见表2、图1。

表2　各组荷瘤小鼠mDC中表面标志物阳性表达率比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，%）

组别	CD11c	CD80	CD86	MHC-Ⅱ
对照组	46.40±6.17	76.40±8.26	71.27±16.94	60.77±2.66
TNF-α组	48.33±4.97	78.17±8.91	77.87±13.95	79.10±6.76[a]
GiP组	48.30±4.95	89.63±9.22	87.13±8.32	80.27±3.15[a]
GiP-B1组	50.87±3.62	91.23±8.98	87.40±10.28	83.57±5.14[a]

a：与对照组比较，$P<0.05$。

3.1.3　GiP及GiP-B1对荷瘤小鼠mDC上清液中细胞因子水平的影响

与对照组比较，GiP组与GiP-B1组荷瘤小鼠mDC上清液中IL-12p70、IL-4水平以及TNF-α组小鼠mDC上清液中IL-4水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表3。

3.2　GiP及GiP-B1促成熟的荷瘤小鼠mDC的抗肿瘤作用及作用机制

3.2.1　荷瘤小鼠mDC刺激$CD4^+$T细胞增殖的作用及二者共培养的最佳比例

荷瘤小鼠mDC与$CD4^+$T细胞的比例分别为1∶5、1∶10、1∶20、1∶40时，与对照组比较，TNF-α组、GiP组及GiP-B1组荷瘤小鼠mDC刺激$CD4^+$T细胞增殖的刺激指数均显著升高（$P<0.05$），其中荷瘤小鼠mDC与$CD4^+$T细胞的比例为1∶5时各组的刺激指数最大且$CD4^+$T细胞增殖最显著（表4）。故选择后续实验荷瘤小鼠mDC与$CD4^+$T细胞的共培养比例为1∶5。

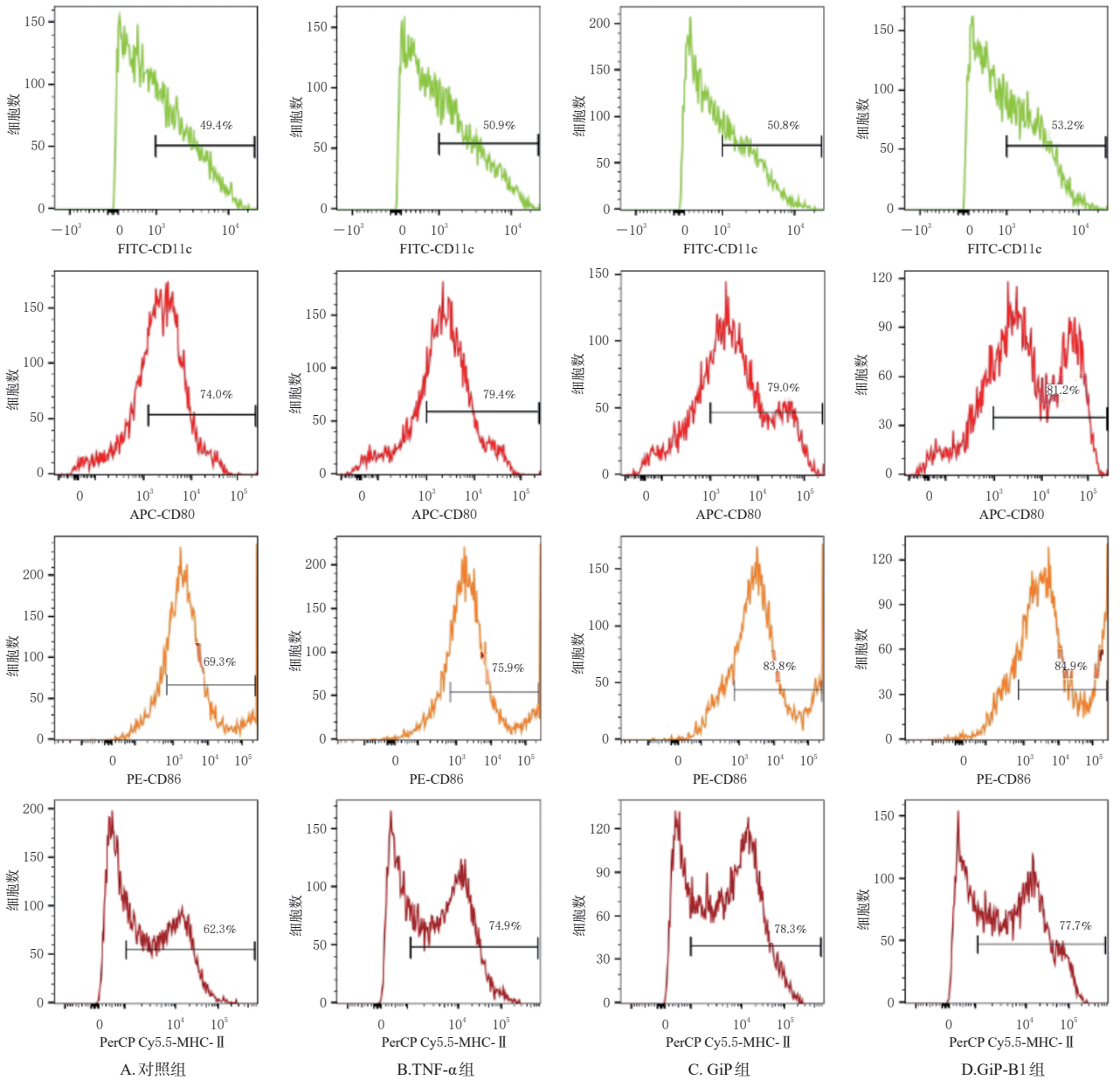


图1　各组荷瘤小鼠mDC中表面标志物表达的流式细胞图

表3　各组荷瘤小鼠mDC上清液中细胞因子水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，pg/mL）

组别	IL-12p70	IL-4	组别	IL-12p70	IL-4
对照组	190.19±28.87	133.50±23.17	GiP组	6 147.65±709.48[a]	174.17±22.56[a]
TNF-α组	519.80±17.42	203.03±8.17[a]	GiP-B1组	6 079.76±244.59[a]	186.31±10.43[a]

a：与对照组比较，$P<0.05$。

表4　各组荷瘤小鼠mDC刺激$CD4^+$T细胞增殖的刺激指数比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	共培养比例1∶5	共培养比例1∶10	共培养比例1∶20	共培养比例1∶40
对照组	10.14±0.33	6.30±0.44	3.60±0.31	1.97±0.18
TNF-α组	17.00±0.85[a]	12.86±0.47[a]	7.16±0.06[a]	3.06±0.11[a]
GiP组	15.13±0.53[a]	10.42±1.17[a]	6.22±0.28[a]	2.46±0.10[a]
GiP-B1组	14.83±0.62[a]	9.69±1.10[a]	5.64±0.23[a]	2.24±0.44[a]

a：与对照组比较，$P<0.05$。

3.2.2　CD4-CTL上清液中细胞因子水平

与对照组比较，TNF-α组、GiP组及GiP-B1组CD4-CTL上清液中IL-12p70（TNF-α组除外）、IFN-γ水平均显著升高，IL-4（TNF-α组除外）、IL-10（GiP组除外）水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表5。

表5　各组CD4-CTL上清液中细胞因子水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，pg/mL）

组别	IL-12p70	IFN-γ	IL-4	IL-10
对照组	619.62±35.03	77.71±15.05	31.02±4.21	33.63±3.68
TNF-α组	820.62±21.68	164.99±23.40[a]	28.99±5.10	26.40±1.76[a]
GiP组	4 346.48±477.45[a]	376.93±6.85[a]	18.57±4.50[a]	29.97±1.80
GiP-B1组	5 418.24±546.84[a]	395.25±16.33[a]	14.96±3.39[a]	23.50±2.65[a]

a：与对照组比较，$P<0.05$。

3.2.3　CD4-CTL对H22细胞的杀伤活性

效靶比分别为10∶1、20∶1、50∶1时，与对照组比较，

TNF-α组（效靶比20∶1除外）、GiP组及GiP-B1组CD4-CTL对H22细胞的杀伤活性均显著增强（$P<0.05$）。结果见表6。

表6　各组CD4-CTL对H22细胞的杀伤活性比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，%）

组别	效靶比10∶1	效靶比20∶1	效靶比50∶1
对照组	3.50±0.26	10.81±1.69	14.12±0.74
TNF-α组	10.74±0.35[a]	12.13±0.87	25.33±2.81[a]
GiP组	13.05±2.23[a]	25.34±1.72[a]	40.93±0.99[a]
GiP-B1组	14.98±1.43[a]	25.26±3.29[a]	43.87±1.43[a]

a：与对照组比较，$P<0.05$。

3.2.4　共培养后荷瘤小鼠mDC中IL-12、IL-12R、STAT-4 mRNA的表达情况

与对照组比较，TNF-α组、GiP组及GiP-B1组共培养后荷瘤小鼠mDC中IL-12、IL-12R（GiP组除外）、STAT-4 mRNA表达量均显著升高（$P<0.05$）。结果见表7。

表7　各组共培养后荷瘤小鼠mDC中IL-12、IL-12R、STAT-4 mRNA表达量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	IL-12/GAPDH	IL-12R/GAPDH	STAT-4/GAPDH
对照组	0.94±0.07	1.01±0.05	1.01±0.04
TNF-α组	2.49±0.55[a]	1.56±0.15[a]	1.82±0.14[a]
GiP组	1.73±0.13[a]	1.13±0.12	1.48±0.12[a]
GiP-B1组	2.85±0.56[a]	1.70±0.13[a]	2.17±0.14[a]

a：与对照组比较，$P<0.05$。

3.2.5　共培养后荷瘤小鼠mDC中IL-12/NF-κB/STAT-4信号通路相关蛋白的表达情况

与对照组比较，TNF-α组、GiP组及GiP-B1组共培养后荷瘤小鼠mDC中IL-12Rβ2蛋白表达量和NF-κB p65、STAT-4蛋白磷酸化水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表8、图2。

表8　各组共培养后荷瘤小鼠mDC中相关蛋白表达比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	p-NF-κB p65/NF-κB p65	IL-12Rβ2/β-actin	p-STAT-4/STAT-4
对照组	0.12±0.01	0.38±0.03	0.28±0.07
TNF-α组	0.48±0.12[a]	0.69±0.04[a]	0.67±0.02[a]
GiP组	0.28±0.04[a]	0.58±0.04[a]	0.49±0.10[a]
GiP-B1组	0.54±0.06[a]	0.92±0.20[a]	0.76±0.13[a]

a：与对照组比较，$P<0.05$。

4　讨论

多糖是一类具有调节免疫、抗氧化、抗肿瘤、抗炎等多种生物活性，且疗效良好、毒副作用低的天然高分子聚合物，在预防和治疗肿瘤中有广泛的应用前景[11]。Wei等[12]发现，铁皮石斛均一多糖DOPA-1能剂量依赖性地抑制肝癌细胞HepG2的生长；刘亚楠等[13]发现，枸杞多糖能激活巨噬细胞RAW264.7并增强IL-6、IL-12分泌，发挥免疫调节作用。巨噬细胞的抗原提呈能力远远不如DC，并且DC迁移到淋巴结的能力对于启动T细胞介导的抗肿瘤反应是必需的。研究发现，黄芪多糖、三七多糖、人参多糖均能诱导DC成熟，从而激活T细胞，增强DC与T细胞的相互作用[14—16]。因此，天然多糖通过促进DC成熟，提高肿瘤免疫疗效，在肿瘤治疗中具有一定的潜力。

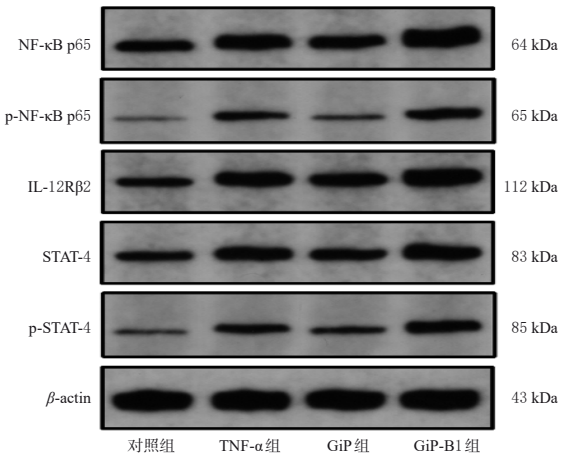


图2　各组共培养后荷瘤小鼠mDC中IL-12/NF-κB/STAT-4信号通路相关蛋白表达的电泳图

表面标志物CD11c代表DC纯度，CD80与CD86是DC激活T细胞的共刺激分子，MHC-Ⅱ是DC抗原提呈分子，上述指标的阳性表达率升高表示DC的抗原提呈功能增强[7]；DC分泌细胞因子的水平是其免疫功能是否成熟的重要指标之一，IL-12p70与IL-4是mDC的主要分泌细胞因子[16]。本研究结果显示，经100 μg/mL GiP和100 μg/mL GiP-B1干预24 h后，荷瘤小鼠mDC的细胞活力、MHC-Ⅱ阳性表达率以及IL-12p70、IL-4水平均显著升高，CD11c、CD80、CD86阳性表达率也有升高趋势，提示GiP与GiP-B1对imDC有促成熟作用。

H22细胞因具备高成瘤性、遗传特性稳定、生长周期短、肿瘤位置与大小易于控制等优点，而成为抗肝癌作用的常用模型[17]。H22细胞在培养过程中易于操作、培养条件易于控制，其所需培养基成分与本研究DC培养基大致相同。因此，本研究采用肝癌细胞H22评价GiP及GiP-B1诱导的mDC的抗肿瘤效应。DC能将肿瘤抗原交叉递呈给$CD4^+$T及$CD8^+$T细胞：前者极化为如抗肿瘤的T辅助性细胞1、促肿瘤的T辅助性细胞2等不同功能亚群；后者激活生成CTL细胞，发挥抗肿瘤效应[4]。本研究将GiP与GiP-B1诱导的荷瘤小鼠mDC与$CD4^+$T细胞共培养，以评估荷瘤小鼠mDC对$CD4^+$T细胞的增殖能力和抗肿瘤效应。本研究结果显示，GiP及GiP-B1促成熟的荷瘤小鼠mDC均能显著刺激$CD4^+$T细胞增殖，增强对H22细胞的杀伤活性。

为了阐明GiP及GiP-B1如何改善并增强mDC激活T细胞，进而发挥抗肿瘤的作用，本研究采用Transwell嵌套装置使mDC与$CD4^+$T细胞间接共培养，以此维持上述细胞的功能和活力，同时只收集mDC用于检测分子水平的变化。结果显示，GiP及GiP-B1共培养后，荷瘤小鼠mDC中IL-12、IL-12R（GiP组除外）、STAT-4

mRNA表达量和IL-12Rβ2蛋白表达量以及NF-κB p65、STAT-4蛋白磷酸化水平均显著升高。这提示GiP及GiP-B1可能通过激活IL-12/NF-κB/STAT-4信号通路来提高荷瘤小鼠imDC、mDC免疫功能及其启动抗肿瘤免疫应答的能力。

综上所述，GiP及GiP-B1对荷瘤小鼠DC的成熟有较好的促进作用，能有效刺激$CD4^+$T细胞增殖并增强CD4-CTL的抗肿瘤活性，其作用机制可能与激活IL-12/NF-κB/STAT-4信号通路有关。然而，GiP及GiP-B1基于调节DC功能的抗肿瘤作用机制有待进一步研究，二者抗肿瘤效应的差异也未做比较，今后还需进行系统的构效关系研究。

参考文献

[1] ANWANWAN D, SINGH S K, SINGH S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2020, 1873(1): 188314.

[2] IGARASHI Y, SASADA T. Cancer vaccines: toward the next breakthrough in cancer immunotherapy[J]. J Immunol Res, 2020, 2020: 5825401.

[3] 李兴航. 树突状细胞疫苗的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2022, 35(10): 1242-1248.
LI X H. Progress in research on dendritic cell vaccines[J]. Chin J Biol, 2022, 35(10): 1242-1248.

[4] GUPTA Y H, KHANOM A, ACTON S E. Control of dendritic cell function within the tumour microenvironment [J]. Front Immunol, 2022, 13: 733800.

[5] HAAS N D, KONING C D, BLASIO S D, et al. Stat family protein expression and phosphorylation state during moDC development is altered by platinum-based chemotherapeutics[J]. J Immunol Res, 2019, 2019: 7458238.

[6] 陈橙. 胀果甘草多糖对树突状细胞表型和功能的影响及作用机制的初步研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2019.
CHEN C. Effects of *Glycyrrhiza inflata* polysaccharides on phenotype and function of dendritic cells and their preliminary mechanism study [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2019.

[7] 俞永婷, 娜迪热木·肖克拉提, 卢泳强, 等. 胀果甘草多糖佐助的树突状细胞疫苗对H22肝癌荷瘤小鼠的免疫治疗作用[J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(1): 35-41.
YU Y T, NADIREMU·XIAOKELATI, LU Y Q, et al. Immunotherapeutic effect of dendritic cell vaccine assisted by *Glycyrrhiza inflata* polysaccharides in H22 hepatoma-bearing mice[J]. Chin J Hosp Pharm, 2024, 44(1): 35-41.

[8] 陈橙, 帕丽达·阿不力孜, 米仁沙·牙库甫, 等. 胀果甘草酸性多糖的分离纯化、结构分析及免疫活性测定[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(12): 4651-4658.
CHEN C, PALIDA·ABULIZI, MIRENSHA·YAKUFU, et al. Isolation, purification, structural analysis and immune activity determination of acid polysaccharides from *Glycyrrhiza inflata* Bat[J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(12): 4651-4658.

[9] 孙冲. 腹腔注射树突状细胞肿瘤疫苗免疫治疗小鼠骨肉瘤的实验研究[D]. 济南: 山东大学, 2018.
SUN C. Experimental study on immunotherapy of mouse osteosarcoma by intraperitoneal injection of dendritic cell tumor vaccine[D]. Jinan: Shandong University, 2018.

[10] 王灿, 董闪闪, 王自强, 等. 鹿瓜多肽体外活性测定方法的探讨研究[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(7): 1196-1201.
WANG C, DONG S S, WANG Z Q, et al. Research on the method for determining the *in vitro* activity of *Cervus* and *Cucumis* polypeptide[J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(7): 1196-1201.

[11] 谢如欣. 多糖抗肿瘤免疫调节机制的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2019, 35(24): 3798-3801.
XIE R X. Research progress on anti-tumor immunomodulatory mechanism of polysaccharide[J]. J Mod Med Health, 2019, 35(24): 3798-3801.

[12] WEI Y, WANG L W, WANG D J, et al. Characterization and anti-tumor activity of a polysaccharide isolated from *Dendrobium officinale* grown in the Huoshan County[J]. Chin Med, 2018, 13: 47.

[13] 刘亚楠, 杨皓凯, 闫亚娟, 等. 枸杞多糖通过MGL/TLR信号通路调控巨噬细胞RAW264.7的活化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(11): 106-112.
LIU Y N, YANG H K, YAN Y J, et al. *Lycium barbarum* polysaccharide regulates activation of RAW264.7 macrophages through MGL/TLR pathway[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(11): 106-112.

[14] BAMODU O A, KUO K T, WANG C H, et al. *Astragalus polysaccharides* (PG2) enhances the M1 polarization of macrophages, functional maturation of dendritic cells, and T cell-mediated anticancer immune responses in patients with lung cancer[J]. Nutrients, 2019, 11(10): 2264.

[15] LIU S N, YANG Y, QU Y, et al. Structural characterization of a novel polysaccharide from *Panax notoginseng* residue and its immunomodulatory activity on bone marrow dendritic cells[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 161: 797-809.

[16] HU Y Y, HE Y, NIU Z Q, et al. A review of the immunomodulatory activities of polysaccharides isolated from *Panax* species[J]. J Ginseng Res, 2022, 46(1): 23-32.

[17] 李香颖, 林乐珍, 蓝焱焱, 等. 罗汉松实多糖对小鼠肝癌H22细胞移植瘤生长的影响及其机制[J]. 山东医药, 2022, 62(36): 44-49.
LI X Y, LIN L Z, LAN Y Y, et al. Effect of polysaccharide from PSP on growth of xenograft tumor in mouse liver cancer H22 cells[J]. Shandong Med J, 2022, 62(36): 44-49.

（收稿日期：2024-04-24　修回日期：2024-08-07）
（编辑：邹丽娟）